

**BOLSA DE INVESTIGAÇÃO**  
**NÚCLEO DE GASTROENTEROLOGIA DOS HOSPITAIS DISTRITAIS 2019**

**1. Título do projeto**

*“microRNA-21 na doença inflamatória intestinal”*

**2. Investigadores**

Catarina Gouveia, MD

Catarina Gomes, MD

André Santos, PhD

Cecília Rodrigues, PhD

Joana Torres, MD, PhD

**3. Instituições envolvidas**

Hospital Beatriz Ângelo, Loures

iMed.Ulisboa, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

**4. Fundamentação teórica**

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores que funcionam como reguladores da tradução e degradação de RNA, estando assim envolvidos em diversos processos biológicos como proliferação, diferenciação, maturação e apoptose celulares.<sup>1</sup> Devido ao seu papel regulador, alterações na expressão destas moléculas têm sido associadas a diversas patologias como cancro, doenças neurológicas e doenças cardiovasculares.

Na doença inflamatória intestinal (DII) os miRNAs demonstraram regular diversas vias que envolvem loci de suscetibilidade à doença. Por exemplo, o alelo de risco do IRGM altera um local de ligação do miR-196, afetando a eficácia da autofagia, e os polimorfismos NOD2 diminuem a expressão de miR-29 em células dendríticas, resultando num aumento das vias inflamatórias mediadas por IL-23, em doentes com doença de Crohn (DC). Além disso, os miRNAs também foram implicados na manutenção da integridade da barreira intestinal na Colite Ulcerosa (CU).<sup>2-4</sup>

Wu et al. foi o primeiro a avaliar os perfis de expressão de miRNA em doentes com DII,<sup>5</sup> e desde então outros estudos identificaram diferenças na expressão miRNAs no tecido intestinal e investigaram o uso desses painéis para distinguir entre DC e CU,<sup>6-8</sup> CU ativa ou quiescente ou DC<sup>9-13</sup> e progressão para displasia.<sup>14</sup> Diversos estudos também sugeriram miRNAs específicos como alvos terapêuticos para o tratamento da DII.<sup>15,16</sup>

O miRNA-21 (miR-21) é considerado um miRNA oncogénico e pro-inflamatório que mostrou estar sobreexpresso em doentes com DII e simultaneamente contribuir para o desenvolvimento de fibrose hepática. Além disso, num estudo piloto levado a cabo pelos nossos co-autores observou-se uma tendência para níveis mais elevados de miR-21 em doentes com colangite esclerosante primária (CEP) e DII quando comparados com doentes apenas com DII, fornecendo evidência de que o miR-21 poderá contribuir para a patogénese do fenótipo CEP-DII.<sup>17,18</sup>

Esta evidência suporta assim que os miRNAs podem ter um valor potencial como biomarcadores em doentes com DII. Embora a expressão deste miRNA esteja relacionada com inflamação e DII, o seu papel exato não está ainda definido, desconhecendo-se a sua correlação com tipo, localização e atividade da doença inflamatória intestinal.

## **5. Objetivos do estudo**

O objetivo principal deste estudo é avaliar a expressão do miR-21 nas biópsias do cólon, sangue e fezes de doentes com doença inflamatória do intestino, e averiguar a sua relação com características clínicas e endoscópicas da doença, bem como marcadores de inflamação (calprotectina e PCR).

## **6. Material e Métodos**

Este estudo irá ser realizado em paralelo com o estudo caso-controlo *“Targeting miR-21 in PSC-IBD patients”* cujo principal objetivo é validar o papel do miRNA-21 e da microbiota intestinal no fenótipo CEP-DII. Neste estudo irão ser colhidas amostras sanguíneas, fecais e biópsias cólicas de 20 doentes com DII, 20 doentes com CEP-DII e 20 controlos saudáveis. Os doentes irão ser recrutados do Hospital Beatriz Ângelo (HBA) em Loures, e noutros hospitais ainda a definir se necessário. Os doentes incluídos irão assinar um consentimento informado. Serão recolhidos dados clínicos e demográficos, e de seguida serão quantificados os níveis de ácidos biliares em amostras de soro e fezes, avaliada a expressão do miR-21 no soro, fezes e biópsias cólicas e será avaliado o microbioma

e os níveis de calprotectina em amostras fecais. Todos os doentes sob terapêutica com ácido ursodesoxicólico (AUDC) irão suspender a terapêutica em questão 2 semanas antes da colheita da amostra fecal e 3 meses antes da colheita os doentes não poderão ter realizado terapêutica antibiótica. As colonoscopias envolvidas neste estudo serão apenas realizadas no decorrer dos cuidados de rotina. Durante a colonoscopia, duas biópsias adicionais do cólon direito e 2 biópsias do cólon esquerdo serão realizadas. A avaliação da calprotectina fecal será realizada através de ELISA.

#### **6.1. Critérios de inclusão:**

- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Capacidade para assinar o consentimento informado;
- Diagnóstico confirmado de CEP-DII e DII por critérios convencionais.

#### **6.2. Critérios de exclusão:**

- Idade menos que 18 anos;
- Incapacidade para assinar o consentimento informado;
- Colectomia total prévia ou transplante hepático;

### **7. Calendarização prevista**

- Projeto já aprovado pela Comissão Científica do HBA, a aguardar aprovação pela Comissão de Ética a reunir no dia 06-09-2019
- Recrutamento de doentes: estimada para 12 meses
- Medições do estudo: 6 meses
- Colheita e análise de dados: 4 meses
- Discussão e apresentação de dados: 3 meses

### **8. Orçamento**

A recolha e armazenamento de amostras ocorrerá principalmente na HBA. A análise da calprotectina fecal será realizada na iMed.Ulisboa, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Parâmetro	Custo por amostra	Custo total
Medição dos níveis de calprotectina fecal	50€	3000€
<b>TOTAL</b>	50€	3000€

Nota: A determinação do miR-21 nas biópsias cólicas e amostras fecais será realizada pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa ao abrigo da Bolsa de Investigação do Grupo de Estudos da Doença Inflamatória.

### Bibliografia

1. **Bartel DP** et al. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
2. **Brest P** et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature genetics*. 2011;43:242.
3. **Brain O** et al. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*. 2013;39(3):521-36.
4. **Yang Y** et al. Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;434(4):746-52.
5. **Wu F** et al. MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2 $\alpha$ . *Gastroenterology*. 2008;135(5):1624-35.e24.
6. **Lin J** et al. Novel specific microRNA biomarkers in idiopathic inflammatory bowel disease unrelated to disease activity. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2014;27(4):602
7. **Schaefer JS** et al. MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunology*. 2015;16(1):5.
8. **Lin J** et al. Novel MicroRNA Signature to Differentiate Ulcerative Colitis from Crohn Disease: A Genome-Wide Study Using Next Generation Sequencing. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*. 2016;5(3):222-9.
9. **Takagi T** et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010;25 Suppl 1:S129-33.

10. **Wu F** et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(10):1729-38.
11. **Coskun M** et al. miR-20b, miR-98, miR-125b-1\*, and let-7e\* as new potential diagnostic biomarkers in ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(27):4289-99.
12. **Min M** et al. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflammatory bowel diseases*. 2014;20(4):652-9
13. **Iborra M** et al. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology*. 2013;173(2):250-8.
14. **Olaru AV** et al. Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(1):221-31
15. **Cheng X** et al. miR-19b downregulates intestinal SOCS3 to reduce intestinal inflammation in Crohn's disease. *Scientific Reports*. 2015;5:10397.
16. **Vermeire S** et al. OP21 ABX464 is safe and efficacious in a proof-of-concept study in ulcerative colitis patients. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2019;13(Supplement\_1):S014-S5.
17. **Zoheir KMA** et al. Study of the therapeutic effects of Lactobacillus and  $\alpha$ -lipoic acid against dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Genet Eng Biotechnol*. 2014;12(2):135-142. doi:<http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.11.001>
18. **Cortez-Pinto H** et al. Microbiota Modulation With Synbiotic Decreases Liver Fibrosis in a High Fat Choline Deficient Diet Mice Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *GE Port J Gastroenterol*. 2016;23(3):132-141. doi:<http://doi.org/10.1016/j.jpge.2016.01.004>